

ヒト iPS 細胞由来ニューロンの構成的培養技術の開発 とそれを用いた薬効評価系の構築

(Development of constitutive culture techniques in human induced pluripotent stem cell derived neurons and its pharmacological assay)

小田原 あおい (Aoi Odawara)

To promote the research of human neuronal networks using cultured human induced pluripotent stem cell derived neurons, I have developed three constitutive culture techniques. One is a 3D collagen gel photo-thermal etching method using an infrared laser that precisely controls the area of cell adhesion and neurite projection by etching a small targeted section of the collagen gel. It was then possible to guide neural network formation under microscopic observation. After conventional cell seeding, we succeeded in creating isolated 3D networks while controlling (1) the number of each neural subtype (neurons, glia, and fluorescent-labeled neurons) and (2) the direction of neurite elongation. Furthermore, we constructed the isolated networks controlling cell number using neurons derived from human induced pluripotent stem cells. This photo-thermal etching technique allows for the creation of designed 3D neural networks during cultivation for use in studies of synaptic transmission, neuron–glial signaling, pathogenesis, and drug responses. Second is a 3D reconstruction neuronal tissue technique using collagen fiber orientation and polydimethylsiloxane microchambers. This technique mimicked the layered structure of the brain (cerebral cortex) on a chip. We used this method to produce 3D neuronal networks by controlling (1) the position of somata and (2) the direction of neurite elongation in the 3D space. The somata area comprised a three-cell layer, and the cell density was equivalent to living tissue. Intracellular Ca^{2+} imaging and extracellular recordings using multielectrode arrays chip detected interlayer synchronous firings in a 3D reconstructed neuronal network. We confirmed that the interlayer propagation was chemical synaptic transmission by pharmacological experiments and that the velocity of propagation was equivalent to biological tissue. Furthermore, we demonstrated the reconstruction of 3D neuronal networks using neurons derived from human induced pluripotent stem cells. This 3D neuronal culture technique could be a useful tool for regenerative medicine and a drug screening model. Third is a maturation method of cultured human iPSC-derived neurons using co-culture of astrocytes. We here used a multi-electrode array (MEA) system to investigate the effects of the co-culture of rat astrocytes with hiPSC-derived neurons. The co-culture facilitated the long-term culture of hiPSC-derived neurons for 300 days and long-term spontaneous firing activity was also observed. After 70 days of culture, we observed synchronized burst firings by synapse transmission. Compared with rat neurons, hiPSC-derived neurons required longer time to mature functionally. Addition of the synapse antagonists induced significant changes in the firing rate. Furthermore, we demonstrated the induction of epilepsy phenomenon by pentylentetrazole (PTZ) and the inhibition by anti-epilepsy drug phenytoin and sodium valproate (VPA). High frequency synchronized bursts were evoked over PTZ 100 μM . These bursts were gradually decreased with the increasing the dose of antiepilepsy drug. In conclusion, we used a MEA system to demonstrate that the co-culture of hiPSC-derived neurons with rat astrocytes is an effective method for studying the function of human neuronal cells, which could be used for drug screening.

1. はじめに

ヒト人工多能性幹細胞（ヒト iPS 細胞）の発見¹⁾や各種細胞への分化技術の発展により、ヒト細胞を用いた基礎研究および再生医療や創薬開発などの応用研究の発展が期待されている。ヒト iPS 細胞から分化させた神経系においても、各種ニューロン、グリア細胞およびアルツハイマー病、パーキンソン病、てんかんなどの患者由来の疾患神経細胞の作製が進み²⁻⁷⁾、基礎研究および再生医療や創薬分野への応用がはじまりつつある。ヒト iPS 細胞由来の各種神経系細胞を使った基礎研究や創薬開発などの応用研究の多くは、培養細胞を用いた研究である。神経系の特徴として細胞ネットワークを対象とした研究となるが、ヒト神経ネットワークの動作原理の理解を進めて行くためには、解析対象となる培養神経ネットワークの問題点を把握し、目的に応じて改善して行くことが望まれる。培養神経ネットワークは一般的にシャーレ上で 2 次元培養されており、その構造はランダムであり、生体環境を模倣していない問題点を有している。また、培養ヒト iPS 細胞由来ニューロンにおいては、その未成熟性が問題となっている。そこで、本研究では、培養神経ネットワークの問題点を一つ一つ解決し、将来的にはヒト神経ネットワークの動作原理を構成論的に理解することを可能にする培養技術（方法論）の開発を行うことを目的とした。具体的な問題点として、①培養神経ネットワークは複雑に結合するため細胞間相互作用の解析が難しい点、②生体神経組織の構造を反映していない点、③生体環境と異なるため未成熟である点に着目した。上記それぞれの問題点を解決ために、(i) 1 細胞レベルで細胞数・細胞種・神経突起の結合関係を自在に制御できる培養技術の開発、(ii) 神経組織の 3 次元層構造を模倣する培養技術の開発、(iii) グリア細胞であるアストロサイトとの共培養によるヒト iPS 細胞由来ニューロンの機能的成熟化培養法の検討を行うこととした。

また、上記、細胞集団を人為的に構築する構成的培養技術を用いてヒト培養神経ネットワークの機能をより深く理解する上では、構築した神経ネットワークに関する機能を解析することが重要となる。本研究では、光学顕微鏡を用いた光計測法と平面微小電極アレイを用いた活動電位計測法を用いて、構築した神経ネットワークの機能計測を実現すると共に、ヒト神経ネットワークを用いた創薬開発などに応用できる薬剤評価系の構築を目指した。

2. 1 細胞レベルで細胞数・細胞種・神経突起の結合関係を自在に制御できる培養技術の開発
コラーゲンゲルをレーザーで溶かす技術を考案し、1 細胞単位で局所神経ネットワークをゲル内にパターンニングする培養法を開発した。

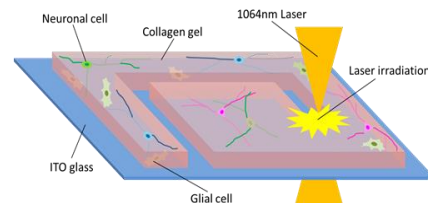


Fig. 1 コラーゲンゲルレーザー加工技術を用いた神経ネットワークのパターンニング技術

具体的には、ITO (Indium Tin Oxide) ガラス上にスピニング法を用いてコラーゲンゲル薄層を作製し、細胞懸濁液をコラーゲンゲル層に播種後、1064nm レーザを用いて、培養中に任意の細胞周囲のゲルを除去する技術である (Fig. 1)。

顕微鏡観察下で、任意の細胞の周りのゲルをレーザー照射により除去することで、他の細胞と隔離することができる。本技術を用いて、1 細胞単位で細胞数 (Fig. 2) や細胞種 (Wild type ニューロンと EGFP(+) ニューロン, ニューロンとグリア細胞) を制御した神経ネットワークを培養中に構築することができた。コラーゲンゲルの膜厚はおよそ 10 μ m 程であり、ゲルからはみ出ることなく 3 次元空間内 (ゲル内) に突起が伸長している様子が観察された。また、培養中に神経突起の伸長方向を任意の方向に誘導し、結合パターンを制御した回路の構築を行うことができた。

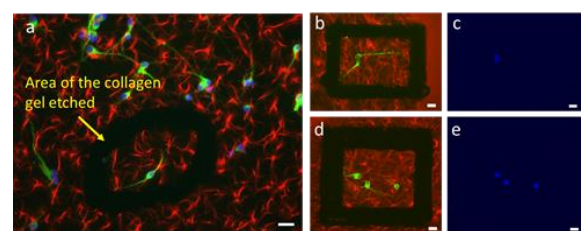


Fig. 2 細胞数を制御した神経ネットワークの構築

隔離した神経細胞の培養 7 日目の免疫化学染色画像。Collagen Type I (赤)、MAP2 (緑)、Hoechst 33258 (青) レーザ加工領域 (黒)。(a) 1 細胞系 (b,c) 2 細胞系 (d,e) 3 細胞系の神経ネットワーク。Scale bars=20 μ m

次に、コラーゲンゲルの濃度に依存した 1 神経細胞の生存率、神経突起の長さを評価したところ、コラーゲンゲル濃度 2mg/ml が培養環境として最も適していることがわかった。パターンニングした神経細胞が機能を有しているかを確認するために、Ca²⁺ imaging 計測を行ったと

ころ、1 神経細胞および数細胞ネットワークにおいて、 Ca^{2+} オシレーションが見られた。このことから、本技術で培養した神経細胞は正常な機能を有していることが確認された。

本技術開発により、細胞パターンニングの研究分野でこれまで難しかった、細胞播種後に 3 次元ゲル内で任意の局所神経ネットワークをパターンニングすることを可能にした。また、この技術は、クリーンルーム等の複雑なマイクロ加工技術を必要としない簡便なパターンニング技術であり、細胞播種後かつ培養中に生きている細胞を選択して、パターンニングできる。故に、高い確率で目的のパターンの神経ネットワークを作製することができた。ヒト iPS 細胞由来ニューロンにおいても、本培養技術を用いて局所神経ネットワークを構築できることがわかったことから、ヒト由来ニューロンを用いた厳密な細胞間相互作用の研究へ応用できることが示唆された⁸⁾。

3. 神経組織の 3 次元層構造を模倣した培養技術の開発

神経組織の構造を模倣する培養技術として、中枢神経系の代表である大脳皮質の層構造に着目し、細胞体の位置と神経突起の伸長方向を制御した層構造を有する 3 次元培養技術の開発を行った。具体的には、PDMS (polydimethylsiloxane) チャンバにより細胞体層の位置を制御し、コラーゲンゲル繊維の配向に沿って神経突起の伸長方向を制御させる 3 次元培養技術である。(Fig. 3)。

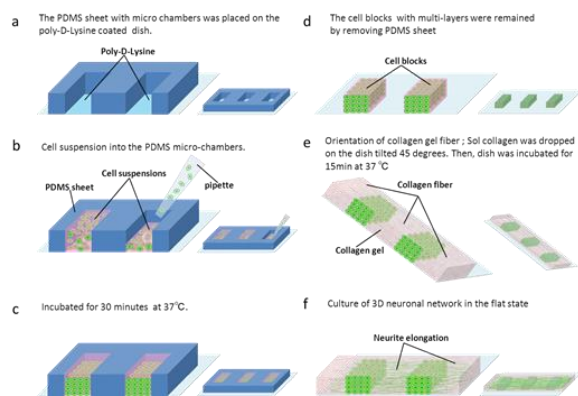


Fig. 3 層構造を模倣した脳神経回路の 3 次元培養技術の模式図

はじめに、コラーゲン繊維の配向によって神経突起の伸長方向が制御できるかを調べた。45°に傾けた培養皿の上からコラーゲンゲルを流して固めるとコラーゲン繊維のバンドルが一方向性を持つことがわかった。その後、神経細胞を培養したところ、バンドルとバンドルの間

に神経突起が一方向に伸長している様子が観察された。これらの結果より、コラーゲン繊維のバンドルを配向させることで神経突起の伸長方向を制御できることがわかった。Fig. 4A は、細胞体の位置と神経突起の伸長方向を 3 次元ゲル内に制御した様子を示している。また、構築した細胞体層が何個の細胞が積み重なってできているかを確認するために、細胞体層の Z 軸切片を作製後、HE (Hematoxylin-Eosin) 染色を行った。その結果、約 50 μm の高さに約 3 細胞が積み重なっていることがわかった(Fig. 5B)。

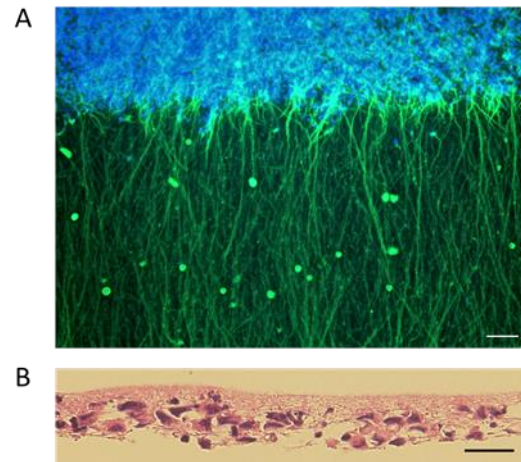


Fig. 5 細胞体位置と神経突起の伸長方向を制御した 3 次元神経組織モデル

(A) 細胞体位置と神経突起の伸長方向を制御した 3 次元脳回路の抗体染色画像。MAP2 (緑)、Hoechst 33258 (青)。Scale bar=100 μm (B) 細胞体層の Z 軸断面の HE 染色画像。Scale bar=50 μm

本技術で構築した 3 次元組織モデルの細胞体の密度は、従来の 3 次元培養とは異なり高い密度を有していた。HE 染色画像から解析した結果、 $43,000 \pm 8,000$ cells/ mm^3 (n=4)であった。この結果は、ヒト大脳皮質 6 層構造の第 2 層から第 6 層における神経細胞の密度 (30,000~80,000 cells/ mm^3) とほぼ同等の密度を示していることがわかった。

次に、機能を有しているかを確認するために Ca^{2+} imaging 計測を行ったところ、層間の同期バーストやいくつかの細胞が個々の独立したリズムで Ca^{2+} オシレーションしている様子が観察された。同期バーストはシナプス伝播によって起こる現象であり、この結果により構築した 3 次元脳回路が機能を有していることを確認できた。

構築した層間の活動電位の伝播を調べるために、非侵襲に多点で活動電位を計測できる平面微小電極アレイ計測法を用いた。平面微小電極アレイ上に層構造を構築し、自発活動計測を行ったところ、層間の同期バースト発火が観察さ

れ、伝播遅延を解析したところ、平均 9.4ms であった。このことから、細胞体層間で化学シナプスを介して活動電位が伝播していることがわかった。また、隣接する細胞体層 A から B、および B から A への伝播速度を解析したところ、平均値は、それぞれ 0.23 m/s, 0.18 m/s であった。大脳皮質スライスにおける伝播速度の報告では、0.26 m/s であったことから、組織における伝播速度と同等であることがわかった。構築した層構造を有する 3 次元回路が各種シナプス機能を有しているかを確認するために、薬理試験を行った。Bicuculline を投与したところ、発火頻度が大幅に増加するとともに、すべてのスパイクが同期し、同期率が 100%を示した。CNQX 投与ではほとんどの発火が消失する様子が観察された。層間の活動電位の伝播時間に着目して解析したところ、投与前は、 $9.9 \pm 2.1\text{ms}$ であったのに対し、Bicuculline 投与時は $3.4 \pm 0.2\text{ms}$ と減少していた。これらの結果より、構築した 3 次元脳神経回路は機能的なシナプス伝播機能を有していること、および 3 次元層構造モデルを用いた平面微小電極アレイ計測法は、薬効評価系として有効であることが示唆された。特に、活動電位の伝播時間を指標に明確に薬剤評価ができる点は、本技術の特徴であると言える。

ヒト iPS 細胞由来ニューロンを用いても層構造を有した 3 次元脳回路が構築できたことから、開発した本技術は、ヒトの正常および疾患神経組織モデルとして、ヒト由来ニューロンを用いた機能解析や薬効評価などへの研究へ応用できることが示唆された⁹⁾。

4. アストロサイト共培養によるヒト iPS 細胞由来ニューロンの機能的成熟化の評価と薬効評価系の構築

ヒト iPS 細胞由来ニューロンの問題点である未成熟性を解決する為の培養技術として、アストロサイト共培養法を考案し、平面微小電極アレイ計測法を用いた機能的成熟化の評価を行った。アストロサイト共培養によるヒト iPS 細胞由来ニューロンの成熟化を評価するために、培養条件として、(i)ニューロンのみでの培養、(ii)アストロサイト液性因子追加培地で培養、(iii)アストロサイト液性因子追加培地およびアストロサイト共培養の 3 つの条件を用意した (Fig. 6)。アストロサイトは、1 か月以上培養した Rat 海馬初代培養細胞を用いた。

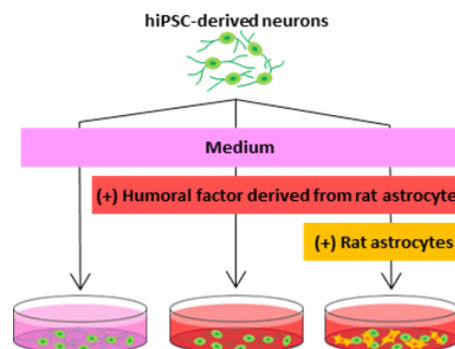


Fig. 6 アストロサイト共培養による成熟化を評価するために用意した 3 つの培養条件

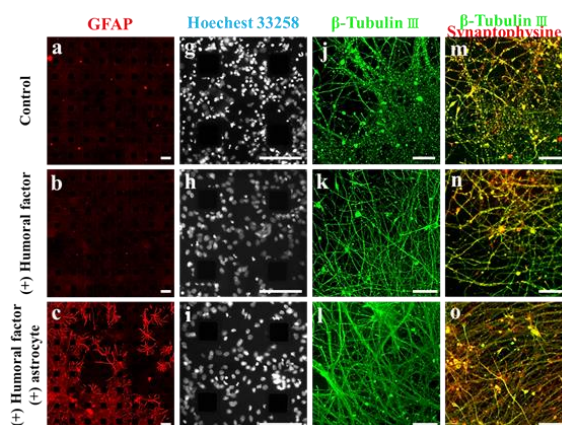


Fig. 7 アストロサイト共培養によるヒト iPS 細胞由来ニューロンの形態学的評価

3 つの培養条件で培養したヒト iPS 細胞由来ニューロンの培養 42 日目の抗体染色画像。(上段)ニューロンのみ、(中段)アストロサイト液性因子追加培地での培養、(下段)アストロサイト共培養。(左赤)GFAP、(白)Hoechst 33258、(緑)β-Tubulin III、(右赤)Synaptophysin。Scale bar=100μm

3 つの条件で培養したヒト iPS 細胞由来ニューロンの培養条件に依存した形態を評価するために、培養 42 日目に免疫化学染色を行った。アストロサイトのマーカーである GFAP で染色を行ったところ、ニューロンのみおよび液性因子追加培地で培養した場合は染色されず (Fig. 7a, b)、アストロサイト共培養においては電極上に多くのアストロサイトが存在している様子が確認された (Fig. 7c)。Hoechst 33258 で核染色を行ったところ、ニューロンのみでの培養は多くの核が断片化し、ダメージがある様子が観察された (Fig. 7g) が、液性因子追加培地およびアストロサイト共培養においては核の断片化は見られなかった。また、神経細胞マーカーである β-Tubulin III で染色を行ったところ、ニューロンのみでは神経突起の断絶やシュリンクしたダメージが多く見られた (Fig. 7j) のに対し、液性因子追加培地およびアストロサイト共培養においては、神経突起がダメージレ

スに健やかに伸長している様子が観察された (Fig. 7k, i)。特に、アストロサイト共培養系においては液性因子追加培地の培養に比べ、神経突起の密度が高く、突起が太い様子が観察された (Fig. 7i)。また、シナプスマーカーである Synptophysine で染色を行ったところ、どのサンプルにおいてもシナプスの発現を確認した (Fig. 7m, n, o) が、特に、アストロサイト共培養において、密なシナプス発現を確認した (Fig. 7o)。これらの結果より、アストロサイト共培養はヒト iPS 細胞由来ニューロンの神経突起の成長とシナプス形成を促すことが示唆された。

アストロサイト共培養による機能的な成熟化の評価として、3 つの培養条件における自発活動特性を調べた。Fig. 8 は、自発活動が検出された電極数と発火頻度の空間パターンをマッピングしたものである。アストロサイト共培養は他の培養条件に比べ、培養 7 日目、21 日目、28 日目、35 日目において自発活動の取得電極数が多く、培養 28 日目および 35 日目で発火数が増加していた。これらの結果から、アストロサイト共培養は、ヒト iPS 細胞由来ニューロンの自発活動を促すことが示唆された。

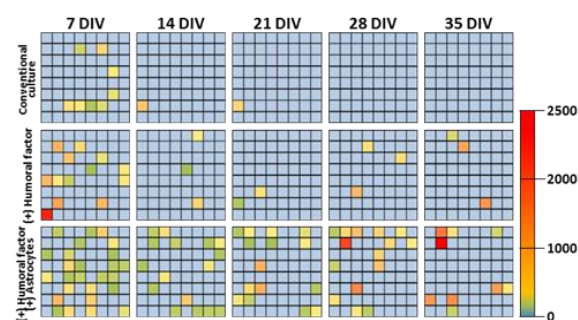


Fig. 8 培養条件と自発活動頻度の経時変化
上段：ニューロンのみで培養したサンプル、中断：
アストロサイトの液性因子のみを追加したサンプル、
下段：アストロサイトと共培養したサンプル。

アストロサイト共培養法がヒト iPS 細胞由来ニューロンの長期培養を可能とし、自発活動を促すことがわかった為、次に、長期間にわたる自発活動特性を調べた。ヒト iPS 細胞由来ニューロンは、大脳皮質ニューロン (hCCNs) を用いた。Fig. 9 は培養 242 日目まで自発活動の周波数に着目して解析を行った結果であり (n = 3 dishes)、培養日数の増加とともに発火頻度が増加し、培養 120 日まで顕著な増加を示していた。バースト発火に着目して継続的に観察を行ったところ、個々の細胞で見られるバースト発火が培養 35 日目以降に出現し、69 日目以降で神経ネットワークが同時にバースト発火する同期バ

ースト発火の出現が見られた。同期バースト発火はシナプス伝播によって起こるものであり、in vivo でも見られる現象で機能的成熟化の指標の 1 つとなっている。このような同期バースト発火は Rat の細胞を用いた場合は培養 1 週間ほどで観察されるが、約培養 70 日目で初めてシナプス伝播による同期バースト発火がみられた。これらの結果から、ヒト iPS 細胞由来ニューロンの機能的な成熟化には時間を有することが示唆された。

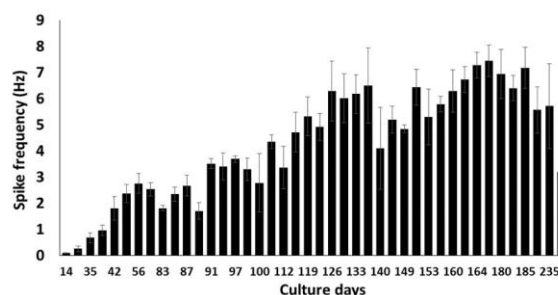


Fig. 9 長期培養による自発活動頻度の経時変化

興奮性・抑制性シナプスが機能しているかを確認するために、シナプス関連薬剤を用いた薬剤応答の検出を行った。興奮性シナプスの作用薬には、NMDA 型受容体のアンタゴニストである D-AP5、AMPA 型受容体のアンタゴニストである CNQX (6-Cyano-7-nitroquinoxaline-2,3-dione)、Kainate 型受容体のアゴニストである Kainic acid を用い、抑制性シナプスの作用薬には、GABA_A 受容体のアンタゴニストである Bicuculline を用いた。Bicuculline および Kainic acid 投与では、発火頻度が上昇し、AP 5 および CNQX 投与では発火頻度が顕著に減少した。Bicuculline 投与時は同期バーストの持続時間が、Kainic acid 投与時には同期バースト発火の回数が大幅に増加した (Fig. 10)。また、同様の実験を培養 100 日前後および培養 240 日前後で行ったところ、240 日目の前後の方が 100 日前後に比べて顕著な薬剤投与による変化が見られた。更に、同期バーストの発生に AMPA 受容体が関与し、培養 240 日目の通常時の同期バースト発火は、NMDA 受容体が強く働いていることがわかった。

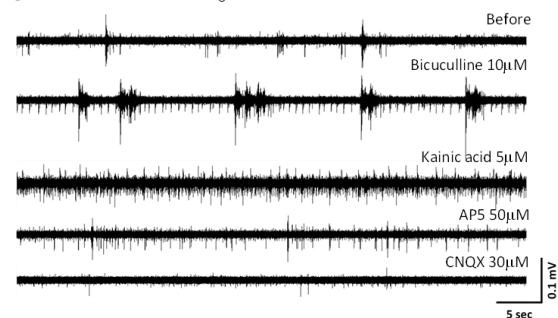


Fig. 10 シナプス関連薬剤による活動変化

我々が考案したアストロサイト共培養によるヒト iPS 細胞由来ニューロンの成熟化培養法と平面微小電極アレイ活動電位計測法を用いた機能評価系を用いて、ヒト脳神経疾患現象の誘発とそれに対する薬剤応答を検出することができれば、ヒト神経疾患における薬効評価系への応用が期待できる。そこで、てんかん現象の誘発と抗てんかん薬の作用の検出を試みた。てんかん発作を引き起こす薬剤として知られている PTZ と抗てんかん薬として電位依存性 Na⁺チャンネルの Na⁺の透過性を抑制する Phenytoin と GABA 受容体からの Cl⁻の流入を促進させる作用のある VPA を用いた。Fig. 11 は PTZ 1 μ M、10 μ M、100 μ M、1mM を投与後、および Phenytoin を 1 μ M、10 μ M、100 μ M の順に投与した時のそれぞれ 5 分間の自発活動をラスター表示したものである。PTZ 100 μ M および 1mM 投与時に高頻度で同期バースト発火を起こすてんかん現象の誘発が観察された。その後の Phenytoin 10 μ M 投与で同期バースト発火の頻度および発火数は投与前と同等となり、Phenytoin 100 μ M においては投与前よりも自発活動の頻度が減少した。VPA 投与においても同様に抗てんかん薬の作用が観察された。

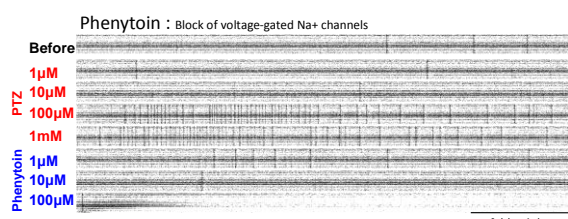


Fig. 11 てんかん現象の誘発と抗てんかん薬の作用

アストロサイト共培養により、これまで困難であった 300 日以上長期培養を実現し、培養日数に依存した自発活動特性と興奮性・抑制性シナプス関連の薬剤投与による応答からシナプス機能の成熟化を確認し、機能的な成熟化には少なくとも 3 ヶ月以上の培養期間が必要であることを明らかにした。また、てんかん現象の誘発と抗てんかん薬の作用を見出し、アストロサイト共培養法を用いたヒト iPS 細胞由来ニューロンの平面微小電極アレイ活動電位計測法はヒト神経疾患における薬効評価系として有効であることが示唆された¹⁰⁾。

5. おわりに

本研究で開発した 3 つの構成的培養技術によって、培養ヒト神経ネットワークを用いた研究がどのように発展するかを考察する。アストロサイト共培養法による機能的成熟化と成熟化に

要する培養日数の知見は、現状のヒト iPS 細胞由来ニューロンを用いて神経ネットワークの機能解析や創薬研究を進めてゆく上で、必須の実験条件となると考えられる。また、平面微小電極アレイを用いた薬剤評価法は、ヒト iPS 細胞由来ニューロンの機能を指標とした創薬スクリーニング、毒性・安全性試験法への応用が大いに期待できる。ヒト由来神経ネットワークの性質や動作原理を厳密に理解する為には、1 細胞レベルの構成的培養技術が有効となる。例えば、グリア細胞との物理的コンタクトによりヒト由来ニューロンが成熟化するメカニズムの研究や成熟化するために最低必要な細胞種や細胞数を同定する研究、ネットワークパターンと電気活動パターンの関係性を理解する研究などを可能にする。層構造を模倣する 3 次元神経ネットワークの構築技術は、生体組織の代替となる組織モデル構築への発展性を有しており、神経機能の理解や薬効評価の精度向上をもたらすことが期待される。また、本開発技術は、生体構造にない層構造を人為的に構築することができるため、大脳皮質が 6 層である必然性の理解といった生体構造の意味を理解する研究も可能とする。

本開発技術の関連性を論述すると、1 細胞レベルの局所神経ネットワーク解析⇒2 次元分散培養系の神経ネットワーク解析⇒3 次元生体組織を模倣する神経ネットワーク解析を実施することができるため、細胞から組織までの階層をボトムアップ的に調べ、階層間の関係性の理解を可能とし、ヒト神経ネットワークの動作原理を構成論的に見出す研究へと発展させることができると言える。すなわち、本論文は、1 細胞レベルから組織レベルまでの神経ネットワーク機能を構成論的に調べることを可能にする一連の培養技術を提案したと総括できる。それぞれの階層における問題点を一つ一つ解決し、ヒト由来神経細胞を用いて神経組織を厳密に再構成することができれば、脳神経回路の動作原理の全貌が将来明らかになるかもしれない。本研究がその一助となれば幸いである。

ただし、構成的研究は常に倫理的問題を踏まえて研究を進める必要がある。

Reference

- [1] Takahashi K, Yamanaka S. Induction of pluripotent stem cells from mouse embryonic and adult fibroblast cultures by defined factors. Cell. 2006;126:663-76.
- [2] Kondo T, Funayama M, Tsukita K, Hotta A, Yasuda A, Nori S, et al. Focal transplantation of human iPSC-derived glial-rich neural progenitors improves

- lifespan of ALS mice. *Stem Cell Reports*. 2014;3:242-9.
- [3] Parent JM, Anderson SA. Reprogramming patient-derived cells to study the epilepsies. *Nat Neurosci*. 2015;18:360-6.
- [4] Peitz M, Jungverdorben J, Brustle O. Disease-specific iPS cell models in neuroscience. *Curr Mol Med*. 2013;13:832-41.
- [5] Shi Y, Kirwan P, Livesey FJ. Directed differentiation of human pluripotent stem cells to cerebral cortex neurons and neural networks. *Nat Protoc*. 2012;7:1836-46.
- [6] Shi Y, Kirwan P, Smith J, MacLean G, Orkin SH, Livesey FJ. A human stem cell model of early Alzheimer's disease pathology in Down syndrome. *Sci Transl Med*. 2012;4:124ra29.
- [7] Shi Y, Kirwan P, Smith J, Robinson HP, Livesey FJ. Human cerebral cortex development from pluripotent stem cells to functional excitatory synapses. *Nat Neurosci*. 2012;15:477-86, S1.
- [8] A. Odawara, M. Gotoh, I. Suzuki. Control of neural network patterning using collagen gel photothermal etching. *Lab on a chip* 2013; 13: 2040-6.
- [9] A. Odawara, M. Gotoh, I. Suzuki. A three-dimensional neuronal culture technique that controls the direction of neurite elongation and the position of soma to mimic the layered structure of the brain. *RSC Advances* 2013; 3: 23620-30.
- [10] A. Odawara, Y. Saitoh, A.H. Alhebshi, M. Gotoh, I. Suzuki. Long-term electrophysiological activity and pharmacological response of a human induced pluripotent stem cell-derived neuron and astrocyte co-culture. *BBRC* 2014; 443(4): 1176-81.